拟黑多刺蚁成虫头部 USP 基因的定位与定量分析及其与 EcR 基因相关性

党 亮, 奚耕思*, 樊瑾瑛, 杨栋梁, 王彦男

(陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

摘要:【目的】超气门蛋白(ultraspiracle protein, USP)是蜕皮激素作用靶标的重要组成部分。本研究拟通过分析在拟黑多刺蚁 *Polyrhachis vicina* Roger USP 基因 *PvUSP* 在不同品级成虫头部 mRNA 表达的差异,推测 *PvUSP* 对其脑神经功能或行为的影响;拟通过饲喂 *PvUSP* dsRNA 对拟黑多刺蚁不同品级成虫 *PvUSP* 进行 RNA 干扰(RNAi),推测 *PvUSP* 对虫体生理功能的影响及其与蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)基因 *PvEcR* 之间功能的相关性。【方法】利用荧光原位杂交及荧光实时定量 PCR 技术对拟黑多刺蚁不同品级成虫头部 *PvUSP* mRNA 组织分布与表达水平进行检测;通过饲喂 *PvUSP* dsRNA 对拟黑多刺蚁不同品级成虫 *PvUSP* 进行 RNAi,采用荧光实时定量 PCR 检测拟黑多刺蚁 *PvUSP* 与 *PvEcR* 表达水平的变化。【结果】*PvUSP* mRNA 广泛表达于拟黑多刺蚁不同品级成虫头部(主要分布于蕈形体),不同品级成虫头部 *PvUSP* mRNA 的表达量不同,工蚁头部表达量最高,雄蚁头部次之,雌蚁头部的表达量最低;RNAi 沉默 *PvUSP* 后,与对照组相比,*PvUSP* mRNA 在不同品级拟黑多刺蚁成虫体内表达量均明显降低,并存在显著差异($P<0.01$);与对照组相比,*PvEcR* mRNA 在各品级表达量均有增加,工蚁和雄蚁表达量变化不显著($P>0.05$),但雌蚁体内 *PvEcR* mRNA 表达量显著增加($P<0.05$)。【结论】*PvUSP* 基因对拟黑多刺蚁不同品级头部神经系统的构建、功能作用的发挥有关;拟黑多刺蚁 *PvUSP* 基因与 *PvEcR* 基因可能在异源二聚体形成过程中存在关联性或功能的互补性;*PvUSP* 可能对雌蚁的生殖功能产生重要影响。

关键词: 拟黑多刺蚁; 超气门蛋白(USP); RNA 干扰; 蜕皮激素受体(EcR);发育调节

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2014)08-0889-08

Positioning and quantitative analysis of ultraspiracle protein gene in the head and its correlation with ecdysone receptor gene in adult *Ployrhachis vicina* (Hymenoptera: Formicidae)

DANG Liang, XI Geng-Si*, FAN Jin-Ying, YANG Dong-Liang, WANG Yan-Nan (College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract:【Aim】Ultraspiracle protein (USP) belongs to an essential component of a heterodimeric receptor complex with the ecdysone receptor (EcR) which binds ecdysteroids. This study aimed to explore the distribution of *USP* mRNA in heads of different castes of *Polyrhachis vicina* Roger adults for inferring the influence of *PvUSP* on the function or behavior of cranial nerve of *P. vicina*, and to assess the influence of *PvUSP* on physiological functions in the body and the relationship with *EcR* gene by feeding *PvUSP* dsRNA as RNAi to different castes of *P. vicina* adults.【Methods】We used real-time fluorescent quantitative PCR technique and fluorescence *in situ* hybridization to test the distribution of *PvUSP* mRNA expression level in the head of different castes of *P. vicina* adults, conducted RNAi on different castes of *P. vicina* adults by feeding *PvUSP* dsRNA, and used the real-time fluorescent quantitative PCR technique to detect the changes in *PvUSP* and *PvEcR* mRNA levels.【Results】*PvUSP* was widely expressed in the head of different castes of *P. vicina* adults, and especially concentrated in the mushroom body. However, its expression level was quite different in the three castes. The highest expression level was found in the head of workers, the moderate expression level was in the head of male adults, and the lowest was in the head of female adults. After using RNAi technique to silence *PvUSP*, the expression level of *PvUSP* mRNA decreased obviously in bodies of different castes of *P. vicina* adults

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171195)

作者简介: 党亮, 男, 1987 年生, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生殖与发育, E-mail: LiangD0426@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-09-25; 接受日期 Accepted: 2014-07-01

as compared to the control, and an extremely significant difference was observed ($P < 0.01$), while the expression levels of *PvEcR* mRNA all increased in different castes. The changes in *PvEcR* mRNA level in workers and male adults were not distinct ($P > 0.05$), while those in the female body showed a dramatic increase ($P < 0.05$). 【Conclusion】*PvUSP* may be related to the structure and functions of nervous system of *P. vicina*. *PvUSP* and *PvEcR* may have relevance in the formation of heterogeneous dimers or function complementarily. *PvUSP* may influence the reproductive functions of female adults of *P. vicina*.
Key words: *Polyrhachis vicina*; ultraspiracle protein (USP); RNAi; ecdysone receptor (EcR); developmental regulation

昆虫变态发育过程中,蜕皮激素通过一系列的激素相关转录因子进行信号的转导和放大,从而完成对生长变态发育的调控。昆虫的蜕皮和变态由蜕皮激素(ecdysteroid, Ecd)和保幼激素(juvenile hormone, JH)联合作用控制,类固醇激素 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)作为昆虫蜕皮激素的主要活性形式,启动昆虫蜕皮(Riddiford *et al.*, 2000),同时保幼激素可以阻止蜕皮激素起始变态,从而维持幼虫的性状(Gilbert *et al.*, 2000)。20E 的转录调控是通过与两个核受体超家族成员结合,即蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)和超气门蛋白(ultraspiracle protein, USP)形成的异源二聚体(Yao *et al.*, 1993)相互作用,起始包括转录因子表达在内的蜕皮级联反应,从而引起昆虫蜕皮(Henrich and Brown, 1995; Thummel, 1995; Riddiford *et al.*, 2000)。

USP 隶属于核受体超家族的第二亚家族,为孤儿核受体,是哺乳动物中视黄醇受体的类似物。USP 可与其他的核受体形成异源二聚体,包括蜕皮激素受体 EcR。USP 及 EcR 具有共同的结构特征:自 N 端起,都是由 A/B 域[转录激活域(transactivation domain)]、C 域[DNA 结合域(DNA-binding domain, DBD)]、D 域[铰链域(hinge region)]、E 域[配体结合域(ligand binding, LBD)]组成,USP 不具有 F 域。USP 对于激素应答基因编码的受体 EcR 和 E75B 以及黑腹果蝇激素受体 3 (*Drosophila melanogaster* Meigen hormone receptor 3, DHR3)的上调是不可或缺的(Schubiger and Truman, 2000)。作为对蜕皮激素的应答,例如 EcR/USP 异源二聚体通过与 20-羟基蜕皮酮的结合调控昆虫的发育、蜕皮和变态过程(Baker *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003)。USP 也是保幼激素的一个候选受体(Xu *et al.*, 2002)。到目前为止还没有鉴定出 USP 的配体(Spindler *et al.*, 2009)。USP 在黑腹果蝇中存在一个单一亚型(Henrich *et al.*, 1990),而在烟草天蛾 *Manduca sexta* Linnaeus 中存在两个具有不同 N 末端结构的亚型 MsUSP-1 和 MsUSP-2 (Jindra *et al.*, 1996)。

昆虫 EcR 是已报道节肢动物核受体中唯一已知配体的核受体。自黑腹果蝇 *EcR* 和 *USP* 基因克隆测序以来,目前已有 20 余种昆虫的 *EcR* 和 *USP* 被克隆测序。拟黑多刺蚁 *Polyrhachis vicina* Roger *EcR* 基因 *PvEcR*(GenBank 登录号:JX028426.1)和 *USP* 基因 *PvUSP*(GenBank 登录号:KC188780)已被克隆测序。在昆虫的基因功能研究中 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)已被证明效果显著。相关的 RNAi 新技术已经应用到昆虫学的不同领域,包括利用 RNAi 技术对基因的功能、调节以及表达的研究(Roignant *et al.*, 2003; Boisson *et al.*, 2006; Arakane *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008)。然而通过对多数的 RNAi 实验发现,饲喂靶标基因 dsRNA,昆虫能够自主性地吸收 dsRNA,dsRNA 在 Dicer 酶的作用下分解成 21 ~23 nt 的 siRNA,通过碱基配对原则来识别靶标基因 mRNA,并使其降解(Schwarz *et al.*, 2002)。

本研究拟通过荧光原位杂交技术对拟黑多刺蚁 3 个品级成虫头部 *PvUSP* mRNA 表达进行组织定位研究,并利用 qRT-PCR 技术对其 3 个品级成虫头部 *PvUSP* mRNA 表达量进行检测,以推测 *Pv*USP 对该虫脑神经功能或行为的影响;通过体外合成 *PvUSP* 保守序列 dsRNA,饲喂拟黑多刺蚁不同品级成虫,观察不同 dsRNA 浓度和时间对拟黑多刺蚁成虫发育和死亡的影响,以推测该基因对拟黑多刺蚁生理功能的影响。通过 qRT-PCR 检测 *PvUSP* RNAi 后 *PvUSP* 及 *PvEcR* 基因在拟黑多刺蚁不同品级成虫体内 mRNA 表达水平的变化情况,从转录水平上认识 *PvUSP* 和 *PvEcR* 基因相关性。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

拟黑多刺蚁(膜翅目,蚁科)购自广西横县宏发

食用蚁研究中心，本研究室饲喂养殖，在自然光照、温度26±3℃和 RH 35%～45%条件下用冰糖、蜂蜜和水果等饲喂。

1.2　主要试剂

RNA 提取试剂 Trizol 购自 TaKaRa 公司，原位杂交试剂购自武汉博士德（Boster）；实验所需试剂盒：RNA 反转录试剂盒（RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit，MBI）；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（北京百泰克）；SYBR® Premix Ex Taq™ Kit（TaKaRa）；加强型敏感性原位杂交检测试剂盒（武汉博士德）；T7 RiboMAX™ Express RNAi System（Promega）。

1.3　拟黑多刺蚁总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成

取拟黑多刺蚁成体工蚁 10 头利用 Trizol RNA 提取液提取总 RNA，取 4 μL 样品用以检测 RNA 质量，用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计（波长 260 nm）检测 RNA 的完整性和浓度，并保证其 A_{260}/A_{280} 值在 1.8～2.0 之间，其余置于 -80℃保存。cDNA 第一链合成使用 MBI 的 RNA 反转录试剂盒（RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit）进行，产物可直接进行 PCR 反应或保存于 -80℃备用。

1.4　引物设计与 PCR 扩增

根据拟黑多刺蚁 *USP* 的序列（GenBank 登录号 KC188780）选择保守序列，利用 Primer Primer 5.0 软件设计引物 USP-F 和 USP-R（表 1），由南京金斯瑞基因公司合成。采用 10 μL PCR 反应体系，PCR 反应条件为：94℃ 3 min；94℃ 50 s，48℃ 50 s，72℃ 60 s，35 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。将 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中检测，用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（北京百泰克生物技术有限公司）回收目的片段，纯化进行克隆送上海生工生物工程有限公司测序。测序结果运用 Clustal X 与 NCBI 中的 Blast 软件进行比对。绿色荧光蛋白基因（*GFP*）片段由陕西师范大学生命科学学院生物化学实验室保存的 GFP 质粒上扩增，利用 Primer Primer 5.0 软件设计引物 GFP-F，GFP-R（表 1），PCR 反应条件为：94℃ 4 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，39 个循环；72℃ 延伸 10 min；4℃保存。将 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中检测，用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（北京百泰克）回收目的片段，纯化进行克隆送上海生工测序。

表 1　本实验所用主要引物设计

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence	产物长度（bp） Product size	引物用途 Primer usage
USP-F	GATGAAGAGGGAGGCGGT	646	*USP* 扩增 Amplification of *USP*
USP-R	CAGACGAAGCAGCAGTTT		
GFP-F	GCAGTGCTTCAGCCGCTACCC	288	*GFP* 扩增 Amplification of *GFP*
GFP-R	CCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC		
USP-7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>GATGAAGAGGGAGGCGGT	686	dsRNA 合成 dsRNA synthesis
USP-7R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>CAGACGAAGCAGCAGTTT		
GFP-7F	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>GCAGTGCTTCAGCCGCTACCC	321	
GFP-7R	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>CCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC		
USP-ISH	ATTAATCCAGGCAACTTCAGTCCTTCGGGTCCCAT CGCACTTTACATCGTTGCCAGTGGCGGATCAAATA GCTTAATCACGATATTCGATGATCGCGTGCTCTCA		荧光原位杂交探针 Fluorescence *in situ* hybridization probes
Real USP-F	AAGTGCCTGGCGATGGG	86	qRT-PCR
Real USP-R	GCTTTCCACCTCGCTTTGA		
Real EcR-F	GCTTGCGATGGATGTGCT	91	
Real EcR-F	CACCTTCAGATTTCGCCTTG		
β-actin-F	CCCTCTTCCAGCCATCGTTC	250	
β-actin-R	CCACCGATCCAGACGGAGTA		

下划线处是 T7 RNA 聚合酶启动子。T7 RNA polymerase promoter is underlined.

1.5　*PvUSP* dsRNA 及 *GFP* dsRNA 的制备和稳定性检测

1.5.1　dsRNA 制备：使用 T7RiboMAX Expression RNAi System（Promega）试剂盒体外合成 dsRNA。合成后有沉淀产生即 dsRNA，适量 RNase-free ddH_2O 溶解，琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计（波长 260 nm）检测完整性和浓度，-80℃冰箱中保存。

1.5.2　*PvUSP* dsRNA 及 *GFP* dsRNA 稳定性检测：

本研究拟将 *PvUSP* dsRNA 加入到介质溶液中，通过拟黑多刺蚁对介质溶液的取食将 dsRNA 导入其肠道内。将 0.1 μg 体外合成的 *PvUSP* dsRNA 加入到 10 μL RNase-free ddH_2O 配制的 0.1 g/mL 冰糖溶液，对 0，2，4，6，8 和 10 h 后 dsRNA 进行取样，琼脂糖凝胶电泳检测其稳定性。同理对 *GFP* dsRNA 进行稳定性检测。

1.6 蚂蚁的饲喂干扰实验

随机选取拟黑多刺蚁成虫 45 头一窝饲养于饲养盒中，饲养盒为透明亚克力材质，盒盖上有透气孔。食物为冰糖或蜂蜜，实验分两个阶段，第 1 阶段设置空白对照组以 RNase-free ddH_2O 饲喂，处理组以 10 ng/μL *PvUSP* dsRNA 饲喂；第 2 阶段以每 100 μL RNase-free ddH_2O 中分别加入 1 000 ng *GFP* dsRNA 即 10 ng/μL 作为 *GFP* 对照组饲喂，同样，处理组以 10 ng/μL *PvUSP* dsRNA 饲喂。每组设置 3 个重复，每天饲喂一次，自然光照条件下饲养，温度 26±3℃，湿度 35%～45%，饲喂周期 12～15 d。

1.7 荧光原位杂交实验

原位杂交试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供，针对 *USP* 的寡核苷酸探针，经地高辛标记，由于采用多相寡核苷酸探针和高敏感标记技术，并配合使用敏感性加强型的原位检测方法，具有敏感性特别高，背景清晰，结果准确可靠的优点。

1.7.1 冰冻切片的制备：将拟黑多刺蚁 3 个品级各 3 头成虫头部用经过消毒处理的剪刀迅速剪下置于含有 0.1% DEPC 的 4% 多聚甲醛固定液中固定 8 h，然后将固定好的材料浸泡在 15% 的蔗糖溶液中，置于 4℃ 冰箱内，待材料全部沉底后，再将实验材料取出浸入到 30% 蔗糖溶液中，再置于 4℃ 冰箱内，待材料全部沉底后进行冰冻切片，切片厚度一般为 12 μm，将切好切片贴至已用多聚赖氨酸处理的载玻片上，37℃ 烘干 6～7 d 后进行荧光原位杂交实验。

1.7.2 荧光原位杂交：0.1% DEPC 水在室温下浸泡载玻片 5 min；30% H_2O_2 一份＋纯甲醇 50 份混合，在室温下浸泡载玻片 30 min；0.1% DEPC 水在室温下浸泡载玻片 5 min×3 次；向载玻片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶；37℃ 恒温箱或室温消化 5～120 s，暴露 mRNA 核酸片段，原位杂交专用 PBS 洗 5 min×3 次，1% DEPC 水在室温下浸泡载玻片 5 min；胃蛋白酶消化后，用含有 0.1% DEPC 的 1% 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS(pH 7.2～7.6) 在室温下固定 10 min，0.1% DEPC 水在室温下浸泡载玻片 5 min×3 次；按每张载玻片 20 μL 滴加预杂交液（阴性对照使用 DEPC 水），置于湿盒内，38℃ 恒温箱 4 h；吸取多余液体，不洗，每张载玻片滴加 20 μL 杂交液（阴性对照不滴加），恒温箱 38℃ 杂交过夜；杂交后揭掉盖玻片，37℃ 作用水温的 2×SSC 洗涤 5 min×2 次，37℃ 0.5×SSC 洗涤 15 min×1 次，37℃ 0.2×SSC 洗涤 15 min×1 次；每张载玻片滴加 20 μL 封闭液，恒温箱 37℃ 30 min；吸取多余液体，不洗，每张载玻片滴加 20 μL 生物素化鼠抗地高辛，恒温箱 37℃ 60 min 或室温下 120 min，后用原位杂交专用 PBS 浸洗 5 min×4 次；取 1 μL SABC-HRP-FITC＋原位杂交专用 PBS 100 μL 配比，按每张载玻片滴加 50 μL，37℃ 30 min，后用原位杂交专用 PBS 浸洗 5 min×3 次；用中性树胶封片，利用激光共聚焦扫描显微镜（Laser Scanning Confocal Microscopy，LSCM）镜检，分析。实验过程设计不加探针处理组作为阴性对照组，荧光显微镜下检测。

1.8 荧光实时定量 qRT-PCR

PvUSP 在不同品级拟黑多刺蚁头部的相对表达。选择雌蚁头部的 cDNA 第一链为模板制作标准曲线，稀释倍数为 1×，5×，10×，100× 和 1 000×。每管样品需 3 个重复，并附有无模板添加的阴性对照。提取 RNAi 后不同品级的拟黑多刺蚁总 RNA，对照组分别为 RNase-free ddH_2O 和 *GFP* dsRNA 饲喂的拟黑多刺蚁总 RNA，采用实时定量 PCR 对处理组即 RNAi 后 *PvUSP* 和 *PvEcR* mRNA 表达量进行检测，以评估 *PvUSP* dsRNA 对拟黑多刺蚁的干扰效率。分别设计目的基因 *PvUSP* 和 *PvEcR* 实时定量引物及内参基因 *β-actin* 特异性引物。采用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq Kit 试剂盒荧光燃料 SYBR Green Ⅰ，在 ABI STEP ONE 上进行。PCR 反应体系 25 μL，反应条件为：95℃ 10 min；95℃ 15 s，52℃ 30 s，40 个循环；95℃ 15 s，52℃ 60 s；95℃ 15 s，每个循环上升 0.3℃，熔解曲线生成。最终结果计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$（Livak and Schimittgen, 2001）法进行，在所有实验组中选择其中一个标本为实验参照标本，即以此标本为准，其他的实验标本与它进行比较。利用 SPSS 16.0 软件计算每种处理的平均值与标准差，并进行显著性差异分析（t 检验，$n=3$，$P<0.01$ 或 0.05）对所得数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取、*PvUSP* 扩增及 *PvUSP* dsRNA 和 *GFP* dsRNA 稳定性检测

总 RNA 提取后琼脂糖凝胶电泳结果显示 3 条

清晰亮带，5S，18S 和 28S rRNA，其中 18S 和 28S rRNA 特征性条带清晰，5S rRNA 较为暗淡，说明总 RNA 没有降解，并且条带单一，总 RNA 没有受到蛋白质和 DNA 的污染，可用于 cDNA 第一链的合成（图 1：A）。利用拟黑多刺蚁总 RNA 为模板（图 1：A），反转得到第一链 cDNA，扩增拟黑多刺蚁 *PvUSP* 片段，得到 646 bp 的单一条带，加入 T7 启动子序列后得到 686 bp 目的条带（图 1：B）。*GFP* dsRNA 常温下稳定性检测，琼脂糖凝胶电泳显示 10 h 后 *GFP* dsRNA 条带亮度变化不明显，表明 dsRNA 在冰糖溶液中 10 d 内未发生降解（图 1：C）。*PvUSP* dsRNA 常温下稳定性检测，琼脂糖凝胶电泳显示 10 d 后 dsRNA 条带亮度变化不明显，这也就表明 *USP* dsRNA 在冰糖溶液中 10 d 内未发生降解（图 1：C）。

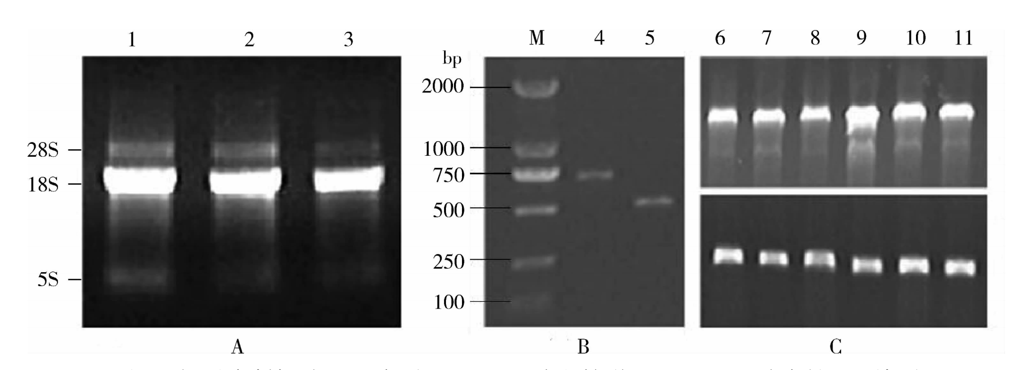


图 1　拟黑多刺蚁总 RNA 提取（A）、USP 片段扩增（B）、dsRNA 稳定性（C）检测

Fig. 1　Total RNA extraction (A), PCR amplification of *PvUSP* (B) and dsRNA stability test (C)

1－3：RNA 重复 RNA replicates；M：DL2000 DNA marker；4：加入 T7 启动子后 *PvUSP* 的扩增片段 *PvUSP* amplified fragment with inserted T7 promoter；5：扩增的 *PvUSP* 片段 *PvUSP* fragment amplification；6－11：分别代表 0，2，4，6，8 和 10 h 后琼脂糖凝胶电泳检测常温下 *GFP* 和 *PvUSP* dsRNA 的稳定性 *GFP* and *PvUSP* dsRNA stability tested by agarose gel electrophoresis at room temperature after 0, 2, 4, 6, 8 and 10 h, respectively.

2.2　*PvUSP* 在拟黑多刺蚁不同品级成虫头部的表达

2.2.1　*PvUSP* 在拟黑多刺蚁不同品级成虫头部组织定位：经激光共聚焦扫描显微镜镜检观察后可见，*PvUSP* mRNA 的细胞胞浆着色呈黄绿色，在拟黑多刺蚁不同品级头部广泛表达，其中工蚁（图 2：A）前脑蕈形体 Kenyon 细胞、中央复合体和嗅叶纤维细胞阳性反应最为明显，蕈形体柄部纤维细胞阳性反应明显，食道下神经节阳性反应明显；雌蚁（图 2：C）蕈形体 Kenyon 细胞、中央复合体、侧前脑阳性反应明显；雄蚁（图 2：E）蕈形体柄部纤维细胞、中央复合体、食道下神经节、中脑和视叶阳性反应最为明显。阴性对照组（图 2：B，D 和 F）荧光显微镜观察无荧光信号，可知探针确为拟黑多刺蚁 *PvUSP* 特异性探针，且拟黑多刺蚁无自发荧光。

2.2.2　*PvUSP* 在拟黑多刺蚁不同品级成虫头部 mRNA 相对表达水平：选取雌蚁头部的 cDNA 第一链作为参照模版，采用荧光实时定量 PCR 反应，发现 *PvUSP* mRNA 在不同品级拟黑多刺蚁成虫头部的表达存在差异，在工蚁头部的表达量最高，在雄蚁头部次之，雌蚁头部的表达量最低（图 3），由此推测在工蚁头部的高表达可能与工蚁的职责及其复杂行为受脑神经系统控制有关。

2.3　*PvUSP* 干扰后拟黑多刺蚁不同品级成虫整体 *PvUSP* 及 *PvEcR* mRNA 表达的变化

RNAi 后不同品级拟黑多刺蚁成虫整体 *PvUSP* 及 *PvEcR* 表达量的变化（图 4）。10 ng/μL *PvUSP* dsRNA 饲喂 15 d 后，拟黑多刺蚁 3 个品级成虫 *PvUSP* 表达量均降低，*PvEcR* 表达量均上升。与 *GFP* dsRNA 饲喂组的表达量相比，实验组工蚁 *PvUSP* 表达量下降至 47.65%，雌蚁 *PvUSP* 表达量下降至 30.48%，雄蚁 *PvUSP* 表达量下降至 40.32%（图 4：C），在统计学上均表现为极显著差异（$P < 0.01$），说明通过饲喂 *PvUSP* dsRNA 在拟黑多刺蚁体内引起 RNAi 效应，导致 *PvUSP* 转录水平的降低；与 *GFP* dsRNA 饲喂组的表达量相比，实验组工蚁 *PvEcR* 表达量上升 77.63%，雌蚁表达量上升 107.32%，雄蚁表达量上升34.18%（图 4：D），雌蚁表达量在统计学上表现为显著性差异（$P < 0.05$），说明拟黑多刺蚁超气门蛋白 *PvUSP* 被沉默后可促进 *PvEcR* 表达量的增加。

3　讨论

拟黑多刺蚁脑分为前脑、中脑和后脑 3 部分，其

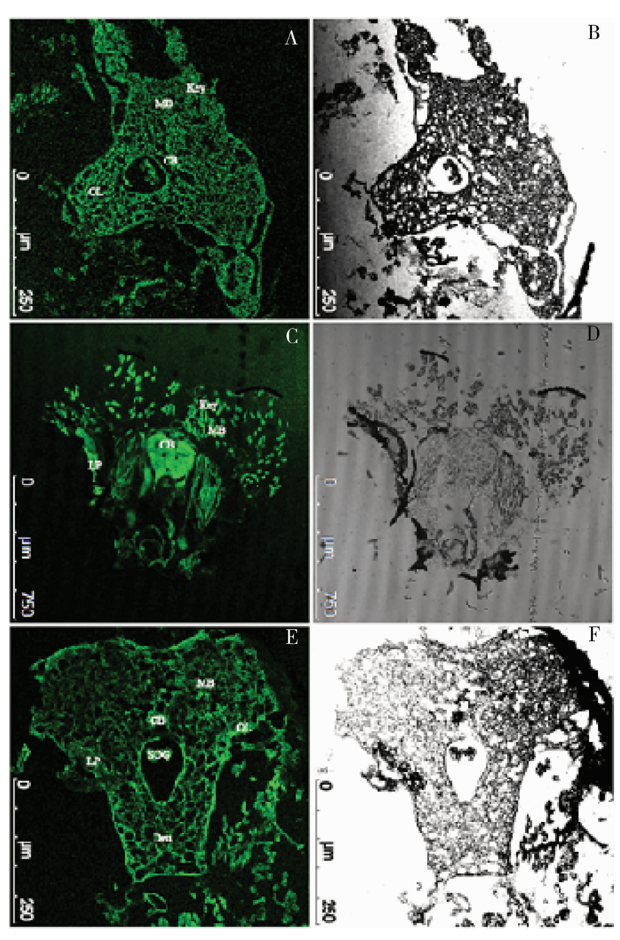


图 2 *USP* mRNA 在拟黑多刺蚁工蚁(A, B)、雌蚁(C, D)和雄蚁(E, F)头部中的定位表达

Fig. 2 Localized expression of *PvUSP* mRNA in heads of *Polyrhachis vicina* worker (A, B), female adult (C, D) and male adult (E, F)

B, D, F: 阴性对照组 Negative controls. MB: 蕈形体 Mushroom body; CB: 中央复合体 Central complex body; Key: Keyron 细胞 Keyron cell; OL: 视叶 Optic lobe; SOG: 食道下神经节 Suboesophagealganglion; Deu: 中脑 Deutocerebrum; LP: 侧前脑 Lateral protcerebrum.

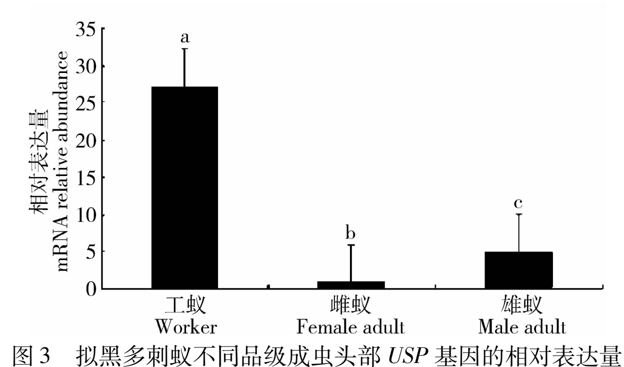


图 3 拟黑多刺蚁不同品级成虫头部 *USP* 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of *PvUSP* in heads of different castes of *Polyrhachis vicina* adults

图中数据均为平均值 ± 标准差($n=3$),柱上不同字母表示参照组与实验组存在显著差异(t 检验, $n=3$, $P<0.05$)。Data in the figure are represented as mean ± *SD* from three independent experiments, different letters above bars indicate significant difference between the control and treatment (t-test, $n=3$, $P<0.05$).

中前脑主要包括蕈形体、视叶、中央体和侧前脑,中脑主要是嗅球。蕈形体是昆虫依赖性学习记忆行为的重要脑部结构,其在社会性昆虫脑部所占的相对脑体积比其他非社会性昆虫要大的多(Nemoto and Hara, 2007)。蕈形体主要是由蕈形体冠、蕈形体柄和蕈形体根组成,蕈形体冠是视觉和嗅觉信息投射的部位,其外围有很多 Kenyon 细胞。蕈形体不仅在昆虫的求偶调节、嗅觉辨别和视觉学习和记忆功能中扮演重要角色,而且还参与进攻行为和控制行走活动等机械运动的调节(Dubnau *et al*., 2001)。*PvUSP* 在拟黑多刺蚁不同品级成虫脑部蕈形体中高表达,表明该基因可能参与了调节拟黑多刺蚁脑部神经系统构建、功能作用的发挥及对其行为的影响。在工蚁嗅叶纤维细胞相对的高表达可能与其社会分工有关。工蚁的社会行为在 3 个品级中最为复杂,包括觅食、抚育幼蚁和清洁蚁巢等,这些行为使得其需具备一定的空间定位、记忆、气味信息的摄取以及信息交流的能力,因此工蚁具备更强的嗅觉信息处理能力;在雌蚁中蕈形体 Kenyon 细胞、中央复合体和侧前脑阳性反应明显,这可能与雌蚁在蚁群中主要行使交配、产卵以及繁殖后代的社会职责有关,*PvUSP* 可能参与其视觉、学习记忆和求偶等行为的构建;在雄蚁视叶相对高表达可能与雄蚁视觉发育有关,雄蚁在婚飞时需依靠其很高的空间分辨能力和较快的信息处理能力,而这些能力的获得需要视觉信息的介导,因而雄蚁具备了发达的视觉神经系统。而对果蝇的研究也证实了蜕皮激素及其受体通过信号通路调节昆虫神经重建,并且与学习和记忆相关(Meguire *et al*., 2001)。

在本实验中,设计饲喂了 621 bp 的 dsRNA,产生了 *PvUSP* 基因的沉默效应。为达到明显 RNAi 效果所需 dsRNA 的有效浓度因物种间的差异而不同,例如存在于鳞翅目和鞘翅目昆虫的同一基因,在鳞翅目昆虫中几乎没有效果的 dsRNA 的浓度,在用于鞘翅目昆虫中时却能达到明显的 RNA 干涉效果(Zhang *et al*., 2008),本实验设置 10 ng/μL dsRNA 进行 *PvUSP* RNAi 实验,采取双对照实验,即分别设置了空白组(RNase-free ddH_2O)及 10 ng/μL *GFP* dsRNA 处理组进行对照实验,以确保实验的准确性。为确定干扰效率,进一步明确 RNAi 后 *PvUSP* 在拟黑多刺蚁中转录水平表达的情况,应用荧光实时定量技术对该基因进行相对表达量的确定。实验结果显示,RNA 干扰后 3 个品级拟黑多刺蚁成虫体内 *PvUSP* 基因的表达均降低,与对照组相

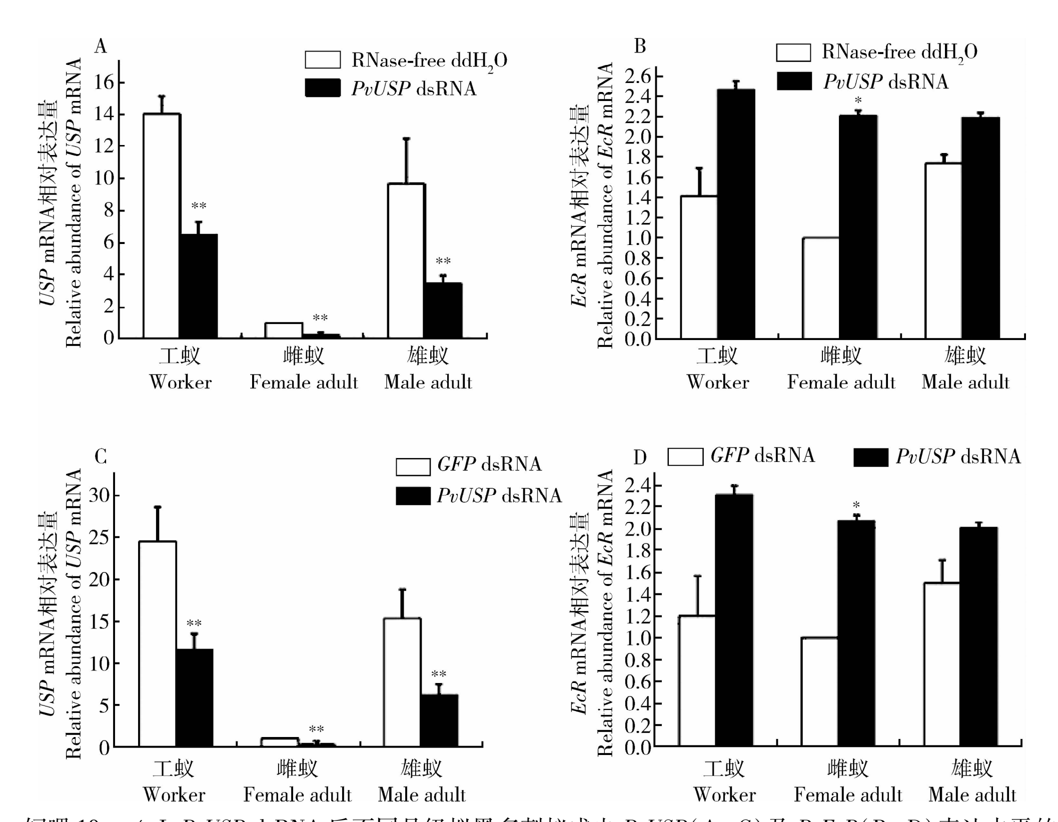


图 4　饲喂 10 ng/μL *PvUSP* dsRNA 后不同品级拟黑多刺蚁成虫 *PvUSP*(A, C)及 *PvEcR*(B, D)表达水平的变化

Fig. 4　Relative expression levels of *PvUSP* (A, C) and *PvEcR* (B, D) in different castes of *Polyrhachis vicina* adults after feeding artificial diet containing 10 ng/μL of *PvUSP* dsRNA

分别以 RNase-free ddH_2O 和 *GFP* dsRNA 作为空白对照和 *GFP* 对照。图中数据均为平均值 ± 标准差($n=3$)；柱上双星号代表组内对比处理组与对照组存在极显著差异(t 检验，$n=3$，$P<0.01$)，而单星号代表组内对比处理组与对照组存在显著差异(t 检验，$n=3$，$P<0.05$)。RNase-free ddH_2O and *GFP* dsRNA were used as the blank control and *GFP* control, respectively. Data in the figure are represented as mean ± *SD* from three independent experiments; double asterisks above bars indicate extremely significant difference between the treatment and the control (t-test, $n=3$, $P<0.01$), while single asterisk indicate significant difference between the treatment and the control (t-test, $n=3$, $P<0.05$).

比均存在极显著差异($P<0.01$)，说明 RNA 干扰实验效果明显。而相对 *PvUSP* 表达量的下降，蜕皮激素受体 *PvEcR* 的表达出现上升趋势，与对照组相比雌蚁表达量差异显著($P<0.05$)，并且发现采取空白对照或 *GFP* dsRNA 饲喂干扰对照，实验结果无差异，说明两种对照均可采用。在果蝇的相关研究中发现 USP 可以抑制 EcR 相关功能的发挥(Costantino *et al*., 2008)，也有研究证明配体不足或者缺乏的情况下，EcR/USP 对基因表达起抑制作用(King-Jones and Thummel, 2005)。在果蝇中蜕皮激素受体与超气门蛋白形成的异源二聚体若两者其一缺失，将导致功能缺失，都会引起早期翅的神经系统的发育异常。这可能就是由于异源二聚体形成过程中配体缺失导致(Schubiger *et al*., 2005)。而拟黑多刺蚁成虫阶段 *PvUSP* 在被成功沉默后，由于 *PvUSP* 缺失，而导致 *PvEcR* mRNA 表达量上升，尤其雌成虫体内 *PvEcR* mRNA 表达量上升比较显著。根据此种现象初步推测，拟黑多刺蚁 *PvUSP* 基因与 *PvEcR* 基因在异源二聚体形成过程中存在关联性或功能互补性，即当 *PvUSP* 缺失，异源二聚体不能正常形成，从而使得 *PvEcR* mRNA 表达量的积累；或当 *PvUSP* 受到抑制时，*PvEcR* 高表达，表明其对 *PvUSP* 功能可能具有一定补偿作用。另外，*PvUSP* 被沉默后雌蚁 *PvEcR* 表达量明显上升的现象暗示着 *PvUSP* 可能对雌蚁的生殖功能产生重要影响。

基于 dsRNA 喂食的拟黑多刺蚁 RNA 干涉技术体系构建成本较低，便于干扰效果的观察和检测，得到的实验结果更接近供试生物的自然状态，本实验采用喂食的方法将 dsRNA 导入拟黑多刺蚁体内，成功干扰了靶标基因 *PvUSP* 的表达，为拟黑多刺蚁功能基因组学的研究提供了有效的方法和研究依据。

参考文献(References)

Arakane Y, Li B, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Park Y, 2008. Functional analysis of fourneuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanism of Development*, 125: 984 - 995.

Baker KD, Shewchuk LM, Kozlova T, Makishima M, Hassell A, Wisely B, Caravella JA, Lambert MH, Reinking JL, Krause H, Thummel CS, Willson TM, Mangelsdorf DJ, 2003. The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell*, 113: 731 - 742.

Boisson B, Jacques JC, Choumet V, Martin E, Xu JN, Vernick K, Bourgouin C, 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Letters*, 580: 1988 - 1992.

Costantino BF, Bricker DK, Alexandre K, Shen K, Merrian JR, Antoniewski C, Callender JL, Henrich VC, Presente A, Andres AJ, 2008. A novel ecdysone receptor mediates steroid-regulated developmental events during the mid-third instar of *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 4(6): e1000102.

Dubnau J, Grady L, Kitamoto T, Tully T, 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*, 411: 476 - 480.

Gilbert LI, Granger NA, Roe RM, 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 617 - 644.

He ZB, Chen B, Feng GZ, 2009. RNA interference and its application in entomology. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(4): 525 - 532. [何正波, 陈斌, 冯国忠, 2009. 昆虫 RNAi 技术及应用. 昆虫知识, 46(4): 525 - 532]

Henrich VC, Brown NE, 1995. Insect nuclear receptor: a development and comparative perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(8): 881 - 897.

Henrich VC, Sliter TJ, Lubahn DB, Macintyre A, Gilbert LI, 1990. A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. *Nucleic Acids Res.*, 18: 4143 - 4148.

Hu X, Cherbas L, Cherbas P, 2003. Transcription activation by the ecdysone receptor (EcR/USP): identification of activation functions. *Mol. Endocrinol.*, 17: 716 - 731.

Jindra M, Malone F, Hiruma K, Roddoford LM, 1996. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, 180: 258 - 272.

King-Jones K, Thummel CS, 2005. Nuclear receptors: a perspective from *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.*, 6: 311 - 323.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 - 408.

MeGuire SE, Le PT, Davis RL, 2001. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science*, 293: 1330 - 1333.

Miller SC, Brown SJ, Tomoyasu Y, 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Genes Evol.*, 218: 505 - 510.

Nemoto M, Hara K, 2007. Ecdysone receptor expression in developing and adult mushroom bodies of the ant *Camponotus japonicus*. *Dev. Genes Evol.*, 217: 619 - 627.

Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW, 2000. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.*, 60(1): 1 - 73.

Roignant JY, Carré C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C, 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, 9: 299 - 308.

Schubiger M, Carré C, Antoniewski C, Truman JW, 2005. Ligand-dependent de-repression via EcR/USP acts as a gate to coordinate the differentiation of sensory neurons in the *Drosophila* wing. *Development*, 132: 5239 - 5248.

Schubiger M, Truman JW, 2000. The RXR ortholog USP suppresses early metamorphic processes in *Drosophila* in the absence of ecdysteroids. *Development*, 127: 1151 - 1159.

Schwarz DS, Hutvágner G, Haley B, Zamore PD, 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell*, 10(3): 537 - 548.

Spindler KD, Höonl C, Tremmel C, Braun S, Ruff H, Spindler-Barth M, 2009. Ecdysteroid hormone action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 3837 - 3850.

Thummel CS, 1995. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell*, 83(6): 871 - 877.

Xu Y, Fang F, Chu YX, Jones D, Jones G, 2002. Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.*, 269: 6026 - 6036.

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, Mckeown M, Cherbas P, Evans RM, 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle gene. *Nature*, 366: 476 - 479.

Zhang S, Kelo L, Nardi JB, Kanost MR, 2008. Multiple alpha subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(4): 365 - 379.

(责任编辑: 赵利辉)